

10/516946

DT05 REC'D PCT/PTO 16 DEC 2004

DOCKET NO.: 263432US0XPCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Bernard PAU et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR03/01842

INTERNATIONAL FILING DATE: June 17, 2003

FOR: OXALIPLATIN ANTI-RESISTANCE AGENT

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
France	02 07417	17 June 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/FR03/01842. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Corwin Paul Umbach

Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Corwin P. Umbach, Ph.D.
Registration No. 40,211

Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

BEST AVAILABLE COPY

10/516946

P U B L I Q U E F R A N Ç A I

FU/FR 03/01842

Rec'd PCT/PTO 16 DEC 2004



REC'D 13 OCT 2003
WIPO PCT

H2

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 23 SEP. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMEMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

INSTITUTION PUBLIQUE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle VI

N° 11354'02

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W - 01/901

REMISE DES PIÈCES		Réervé à l'INPI
DATE	17 JUIN 2002	
LIEU	75 INPI PARIS	
N° D'ENREGISTREMENT	0207417	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		
DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI	17 JUIN 2002	
Vos références pour ce dossier (facultatif)		
239852-D20344 THG		
Confirmation d'un dépôt par télécopie		
<input type="checkbox"/> NATURE DE LA DEMANDE <input checked="" type="checkbox"/> Demande de brevet <input type="checkbox"/> Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/> Demande divisionnaire <i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> <input type="checkbox"/> Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		
<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie Cochez l'une des 4 cases suivantes		
<input checked="" type="checkbox"/> N° <input type="checkbox"/> N° <input type="checkbox"/> N° <input type="checkbox"/> N°		
Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> Date <input type="text"/> : <input type="text"/> : <input type="text"/> Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>		
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) AGENT ANTI-RESISTANCE A L'OXALIPLATINE		
DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		
<input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»		
DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		
<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique		
Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF Domicile ou siège Rue Code postal et ville Pays Nationalité N° de téléphone (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACTERE SCIENTIFIQUE ET TECHNO. 304981310 3, rue Michel Ange, 75016 PARIS		
FRANCE Française N° de télécopie (facultatif)		
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»		

Remplir impérativement la 2^{me} page

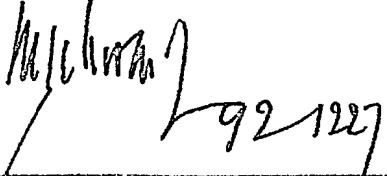
BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILISATION

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

RENDEZ DES PIÈCES		Réserve à l'INPI
DATE		
LIEU	17 JUIN 2002	
N° D'ENREGISTREMENT	75 INPI PARIS	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		0207417

DB 540 W / 010291

Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		239852 THG
16 MANDATAIRE		
Nom		
Prénom		
Cabinet ou Société		Cabinet REGIMBEAU
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	20, rue de Chazelles
	Code postal et ville	75847 PARIS CEDEX 17
	Pays	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01 44 29 35 00
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01 44 29 35 99
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		info@regimbeau.fr
17 INVENTEUR (S)		
Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques		
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
18 RAPPORT DE RECHERCHE		
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance <i>(en deux versements)</i>		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
19 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		
		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention <i>(joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence)</i> : AG _____
Si vous avez utilisé l'imprimé « Suite », indiquez le nombre de pages jointes		
20 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE <i>(Nom et qualité du signataire)</i>		 M. BLANCANEAUX
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI

L'invention concerne le traitement de cancers chez des patients présentant une résistance à l'oxaliplatine.

L'invention concerne notamment le diagnostic de la résistance des cancers colo-rectaux au médicament anti-tumoral "oxaliplatine" (dénomination commune internationale de ce produit, dont le nom commercial est l'Eloxatine).

L'invention concerne également la réduction de cette résistance par des traitements appropriés utilisant des agents « anti-résistance », améliorant l'efficacité du traitement à base d'oxaliplatine (en association avec l'oxaliplatine ou en deuxième intention, après développement d'une résistance à l'oxaliplatine).

Les traitements chimiothérapeutiques des cancers colo-rectaux, malgré la disponibilité de molécules anti-tumorales actives comme l'oxaliplatine, voient leur efficacité très limitée par la survenue fréquente d'une résistance des cellules tumorales aux effets cytotoxiques des médicaments, utilisés seuls ou en combinaison. La réduction de cette résistance est donc un enjeu majeur pour la santé et l'industrie pharmaceutique. Des traitements à l'oxaliplatine, anticancéreux dont l'administration vise à détruire les cellules cancéreuses, sont notamment décrits dans les documents US 5 716 968, EP 943 331.

L'atteinte de cet objectif, revenant à créer des traitements "anti-résistance" associés aux médicaments anti-tumoraux comme l'oxaliplatine, nécessite l'identification de mécanismes moléculaires jusqu'à présent non élucidés qui gouvernent l'émergence de la résistance à l'intérieur des cellules tumorales.

L'identification de ces mécanismes, inconnus à ce jour dans le cas de la résistance des cancers, notamment des cancers colo-rectaux, à l'oxaliplatine, vise donc principalement deux applications :

- le diagnostic précoce de la résistance : il s'agit d'éviter des chimiothérapies qui n'auraient aucun bénéfice thérapeutique, alors qu'elles représentent un risque toxique et un coût important,
- le traitement par des médications contrariant ou contournant les mécanismes de résistance.

Il est important de noter qu'il n'existe dans l'art antérieur aucun test précoce de résistance au traitement par l'oxaliplatine.

Résistance à l'oxaliplatine: L'oxaliplatine est un sel de platine possédant un spectre d'activité anti-tumoral beaucoup plus large que les sels de platine conventionnels comme le cisplatine ou le carboplatine. Les mécanismes de résistance au cisplatine ont pu être en grande partie élucidés mais ne rendent pas compte de la résistance à l'oxaliplatine. Plus particulièrement, les dérégulations des systèmes de réparation MMR ou NER associées à la résistance au cisplatine ne confèrent pas de résistance à l'oxaliplatine. La résistance à l'oxaliplatine restait jusqu'à la présente invention inexpliquée. L'oxaliplatine ($C_8H_{14}N_2O_4Pt$, [(1R, 2R)-1, 2-cyclohexanediamine-N, N'] [oxalato (2-)O, O'] platinum), est un diaminocyclohexane connu pour endommager l'ADN. La présente invention couvre la résistance à l'oxaliplatine, ainsi que le cas échéant à des dérivés de l'oxaliplatine qui donnent lieu également une résistance.

Deux études, menées sur le même modèle cellulaire de cancer ovarien (lignée ATCC A2780), identifient un mécanisme potentiellement effecteur de la résistance à l'oxaliplatine de ce type de cancer : une augmentation de glutathion intracellulaire, ainsi qu'une diminution d'accumulation intracellulaire de platine et d'adduits ADN-platine sont associés à la résistance à l'oxaliplatine. Mais ces études n'apportent pas de démonstration fonctionnelle à ces identifications. L'hypothèse d'implication du glutathion est soulignée dans le document Cancer Lett 1996 Jul 19;105(1):5-14, Altered glutathione metabolism in oxaliplatin resistant ovarian carcinoma cells (El-akawi Z, Abu-hadid M, Perez R, Glavy J, Zdanowicz J, Creaven PJ, Pendyala L.), Department of Investigational Therapeutics, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY 14263, USA.

Une hypothèse de l'intervention de mécanismes de réparation de l'ADN est avancée dans le document Cellular and Molecular Pharmacology of Oxaliplatin, Vol. 1, 227-235, January 2002 Molecular Cancer Therapeutic, (Eric Raymond, Sandrine Faivre, Stephen Chaney, Jan Woynarowski and Esteban Cvitkovic).

Toutefois ces études ne permettent pas d'expliquer avec certitude les mécanismes de résistance observée.

Ainsi, l'invention vise à pallier les inconvénients de l'art antérieur, et en particulier à élucider les mécanismes de résistance des cancers, notamment des cancers colo-

rectaux, à l'oxaliplatine, pour pouvoir mettre en œuvre un diagnostic précoce de la résistance au cours du traitement, et concevoir une démarche pharmacologique rationnelle pouvant aboutir à la mise au point de traitements « anti-résistance » mieux ciblés sur ces mécanismes.

- 5 Inversement, la réalisation de tests diagnostiques précoces de la résistance permettra, au moins, d'informer le médecin cancérologue de la nécessité de réorienter le traitement (par exemple en introduisant d'autres médicaments dans le schéma thérapeutique). Le bénéfice en sera la réduction d'effets indésirables et la limitation de dépenses de santé inutiles. De plus, la disponibilité de traitements spécifiques
- 10 10 (médicaments, thérapies géniques...) contrariant ou contournant la résistance au niveau des mécanismes mis en évidence (apoptose mitochondriale), restaurera l'efficacité de l'oxaliplatine. Le bénéfice sera évidemment médical mais également économique : le gain d'efficacité justifiera le maintien et l'extension de l'utilisation de l'oxaliplatine.
- 15 Les inventeurs ont eu à résoudre plusieurs problèmes techniques dont la mise en place d'un modèle expérimental fiable (sélection et caractérisation de lignées cellulaires résistantes à l'oxaliplatine à partir de lignées référencées) et l'exploration de ce modèle (identification de l'altération de l'apoptose mitochondriale en tant que marqueur de la résistance spécifique à l'oxaliplatine).
- 20 20 Les inventeurs ont réussi à démontrer que la résistance à l'oxaliplatine est associée à l'expression anormale de gènes d'apoptose mitochondriale. L'art antérieur décrit des composés inducteurs d'apoptose agissant directement et spécifiquement au niveau mitochondrial. Toutefois le lien entre l'apoptose mitochondriale (AM) et des mécanismes de résistance à l'oxaliplatine n'est nullement décrit ou suggéré dans l'art
- 25 antérieur.

Les inventeurs ont ainsi mis au point une méthode de diagnostic de la résistance à l'oxaliplatine, reposant sur la mise en évidence de marqueurs de l'altération de l'apoptose mitochondriale dans les cellules tumorales, par tout moyen approprié : biochimique comme l'immunodétection, génétique comme le séquençage ou la quantification des transcrits.

Ainsi selon un premier aspect l'invention concerne un procédé de détection, in vitro ou in vivo, de la résistance de cellules cancéreuses à un traitement à l'oxaliplatine, comprenant la mesure de l'apoptose mitochondriale de cellules cancéreuses traitées ou pouvant ou devant être traitées à l'oxaliplatine. Par résistance de cellules 5 cancéreuses traitées à l'oxaliplatine on entend que les cellules cancéreuses, d'un patient ou en culture, résistent au traitement à l'oxaliplatine de manière telle que ce traitement n'est pas totalement satisfaisant car ne permettant pas de les détruire à un niveau suffisant.

Ce procédé de détection concerne notamment les cancers colorectaux. Cependant 10 d'autres cancers dont le traitement comprend l'administration d'oxaliplatine font également partie de l'invention, en particulier certains cancers des ovaires, des cellules germinales, du poumon, des voies digestives, de la prostate, du pancréas, de l'intestin grêle, de l'estomac.

Selon une réalisation le procédé de détection comprend la mesure de l'expression 15 d'au moins un gène d'apoptose mitochondriale. Par « expression d'au moins un gène d'apoptose mitochondriale », on entend le niveau d'expression d'au moins un gène effecteur ou marqueur d'apoptose mitochondriale. Par gène effecteur, on entend un gène responsable au moins en partie de l'apoptose mitochondriale, cette expression pouvant se traduire notamment par la quantité d'ARNm produite, la quantité de 20 protéines codées par ces gènes, le niveau d'activité de ces protéines. Par exemple un niveau d'apoptose faible peut être dû à la synthèse d'une protéine d'apoptose dont la séquence diffère par rapport à celle d'un patient non résistant, la quantité de protéine étant normale mais son activité biologique étant plus faible. Par gène marqueur on entend un gène qui n'est pas nécessairement impliqué dans les mécanismes de 25 l'apoptose mitochondriale, mais dont le niveau d'expression est corrélé à un niveau d'apoptose déterminé.

Parmi les gènes effecteurs ou marqueurs d'apoptose mitochondriale, on pourra en particulier analyser, en plus des gènes déjà étudiés par les inventeurs (gène Bax notamment), des gènes connus pour leur implication dans les mécanismes d'apoptose 30 mitochondriale, décrits notamment dans le document US 6 268 398 :

- des facteurs initiant ou stimulant la cascade d'apoptose et/ou l'activité de protéases caspases (Thornberry and Lazebnik, Science 281:1312-1316, 1998), tels que le cytochrome c, qui sont libérés suite à un stress oxydatif ;
 - des « facteurs inducteurs d'apoptose » décrits dans Murphy, Drug Dev. Res. 46:18-25, 1999 ;
 - des facteurs induisant la condensation de la chromatine (Marchetti et al., Cancer Res. 56:2033-38, 1996) qui précède l'apoptose ;
 - des protéines Bcl-2, connues pour leur activité anti apoptose, situées dans la membrane externe des mitochondries (Monaghan et al., J. Histochem. Cytochem. 40:1819-25, 1992), qui protègent les membranes contre le stress oxydatif (Korsmeyer et al, Biochim. Biophys. Act. 1271:63, 1995 ; Nguyen et al., J. Biol. Chem. 269:16521-24, 1994) notamment en bloquant la libération de cytochrome c et l'activation de la caspase 3 (Yang et al, Science 275:1129-1132, 1997; Kluck et al., Science 275:1132-1136, 1997).
- 15 L'homme du métier dispose de nombreuses techniques appropriées de mesure de l'expression de gènes. On citera par exemple :
- la mesure d'ARNm et d'ADNc, à l'aide de techniques de RT-PCR, de Northern blot, d'hybridation à des banques de cDNA (Sambrook et al., Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York (1989), de techniques de differential display (Liang et al., 1995, Curr. Op. Immunol. 7:274-280 ; EP 534 858), de techniques utilisant des puces à ADNc ou des oligonucléotides (Eisen, M. B. and P. O. Brown, Methods Enzymol, 303:179-205 (1999); Brown, P. O. and D. Botstein, Nat Genet, 21(1 Suppl):33-7 (1999); Cheung, V. G., et al., Nat Genet, 21(1 Suppl):15-9(1999)) ;
 - la mesure de protéines à l'aide d'analyses western-blot, immunohistochimiques.

Par exemple, la quantification de cytochrome c peut utiliser une méthode spectrophotométrique, immunochimique. La libération de cytochrome c des mitochondries peut être suivie par exemple à l'aide de méthodes immunologiques, de la spectrométrie MALDI-TOF couplée à une capture par affinité (notamment pour

l'apocytochrome c et l'holo cytochrome c), du système SELDI (Ciphergen, Palo Alto, USA).

La mesure de l'activité de caspases peut utiliser des tests sur des substrats de caspases (Ellerby et al., 1997 J Neurosci. 17:6165), tels que le peptide marqué synthétique Z-Tyr-Val-Ala-Asp-AFC, Z étant un groupement benzoyle carbonyle et AFC le 7-amino-4-trifluoromethylcoumarin, sur des protéines nucléaires telles que le UI-70 kDa et le DNA-PKcs (Rosen and Casciola-Rosen, 1997 J. Cell. Biochem. 64:50; Cohen, 1997 Biochem. J. 326:1).

Dans la mesure où le niveau anormalement faible d'apoptose mitochondriale peut être dû à plusieurs gènes, la détection peut impliquer la mesure du niveau d'expression de plusieurs gènes d'apoptose : on peut ainsi déterminer le profil d'expression de plusieurs gènes comparé entre des patients dont on diagnostique la résistance et des patients non résistants. En déterminant des profils d'expression suffisamment précis, le clinicien pourra détecter un phénotype résistant, mais aussi prévoir des résistances pour optimiser la thérapie.

Les gènes d'apoptose mitochondriale peuvent faire partie de l'ADN mitochondrial ou de l'ADN nucléaire.

Selon une réalisation, le procédé de détection comprend la mesure de la quantité de protéine Bax dans les cellules cancéreuses, la mesure des ARNm codant la protéine Bax.

Selon une réalisation le procédé de détection comprend :

- a) la détermination du niveau d'apoptose mitochondriale et/ou du niveau d'expression d'au moins un gène d'apoptose mitochondriale de cellules cancéreuses prélevées chez un patient traitées à l'oxaliplatine ;
- b) la comparaison du niveau d'apoptose mitochondriale avec un échantillon contrôle d'un patient non résistant à l'oxaliplatine.

Un niveau d'apoptose mitochondriale inférieur indique une résistance. Un niveau d'expression inférieur indique une résistance dans le cas d'un gène effecteur stimulateur de l'apoptose mitochondriale, un niveau d'expression supérieur indique

une résistance dans le cas d'un gène effecteur inhibiteur de l'apoptose mitochondriale.

Les écarts de niveaux d'expression analysés sur un nombre suffisant de patients permettent de déterminer le risque et le degré de résistance, les écarts quantitatifs significatifs observés pouvant être faibles ou élevés selon les gènes impliqués.

On peut utiliser des échantillons par exemple de biopsies sur un individu atteint d'un cancer à différents moments. Par exemple, un premier échantillon correspond à l'instant du diagnostic et un second échantillon est obtenu à un second instant après un traitement du patient avec une composition comprenant un agent anti-résistance.

Le diagnostic peut aussi être effectué suite à une thérapie génique, par exemple pour évaluer le niveau d'apoptose mitochondriale suite au transfert de séquences d'acides nucléiques codant pour des protéines d'apoptose mitochondriale.

L'invention concerne également un procédé pour la détection de cellules cancéreuses résistantes à l'oxaliplatine comprenant la mise en contact de l'échantillon biologique examiné avec au moins un anticorps capable de reconnaître une protéine d'apoptose ou un fragment biologiquement actif de cette protéine, et la mise en évidence du complexe antigène-anticorps éventuellement formé.

Pour la mise en oeuvre de ce procédé on pourra utiliser un kit comprenant :

- a) un anticorps par exemple monoclonal ou polyclonal ;
- 20 b) éventuellement les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ;
- c) éventuellement les réactifs permettant la mise en évidence des complexes antigènes-anticorps produits par la réaction immunologique.

Ainsi, des anticorps peuvent être utilisés pour détecter les protéines d'apoptose sous exprimées. De préférence, pour une protéine d'apoptose donnée, les anticorps reconnaissent les épitopes de la protéine qui ne sont pas présents dans d'autres protéines.

Les anticorps destinés à reconnaître spécifiquement un ou plusieurs épitopes des protéines d'apoptose, en particulier la protéine Bax, peuvent être notamment des anticorps monoclonaux, polyclonaux, humanisés, chimériques, des anticorps simples

chaînes, des fragments Fab, des fragments Fab'2, des fragments produits par une banque d'expression Fab, des anticorps anti-idiotypiques.

- Les anticorps monoclonaux, population homogène d'anticorps pour un antigène particulier, peuvent être obtenus à l'aide de techniques connues de l'homme du métier telles que la technique des hybridomes de Kohler et Milstein (Nature 256:495-497, 5 1975; and U.S. Pat. No. 4,376,110), la technique des hybridomes de cellules B humaines (Kosbor et al., Immunology Today 4:72, 1983; Cole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030, 1983), la technique des hybridomes EBV (Cole et al., "Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy," Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96, 1985).
- 10 On peut également préparer des anticorps monoclonaux à l'aide de kits de banques de phage display commercialisés par Pharmacia ou Stratagène.

Des anticorps chimériques peuvent être obtenus selon une technique de Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855. Des banques d'expression Fab peuvent être construites selon la technique de Huse et al., Science 246:1275-1281, 1989. Des 15 anticorps anti-idiotypiques peuvent être obtenus par la technique de Greenspan et Bona, FASEB J. 7:437-444, 1993.

Selon un autre aspect l'invention concerne un procédé de détection de la résistance d'un cancer à l'oxaliplatine comprenant la détection in vitro ou in vivo d'au moins une mutation indicatrice d'une apoptose défectiveuse de cellules cancéreuses en cas 20 de traitement à l'oxaliplatine. L'identification de telles mutations permet un diagnostic précoce qui permet de mieux cibler la thérapie et d'éviter des traitements inappropriés. Le séquençage comparé de gènes d'apoptose entre des patients dont on diagnostique précocément la résistance et des patients résistants peut également être utilisé. Ainsi le procédé de détection peut comprendre par exemple la détection d'une 25 mutation dans une région du gène Bax contenant une série de 8 déoxyguanines.

L'invention concerne également un procédé pour la détection de cellules cancéreuses résistantes à l'oxaliplatine mettant en œuvre au moins une séquence amorce ou sonde spécifique d'un gène d'apoptose mitochondriale tel que le gène Bax, obtenue par des techniques appropriées de construction utilisant des séquences repérées par exemple 30 dans Genbank.

L'invention concerne ainsi un procédé comprenant :

- a) l'isolement de l'ADN mitochondrial à partir de l'échantillon biologique à examiner, ou l'obtention d'un ADNc à partir de l'ARN de l'échantillon biologique ou d'ADN génomique;
- 5 b) l'amplification spécifique de l'ADN du a) à l'aide d'au moins une amorce d'amplification d'un gène d'apoptose mitochondriale notamment du gène Bax.

On pourra utiliser ainsi un kit de diagnostic de la résistance à l'oxaliplatine comprenant des moyens d'extraction de l'ADN mitochondrial de cellules cancéreuses, des moyens de détection et d'amplification d'ARNm de gènes 10 d'apoptose mitochondriale, par exemple du gène Bax, ou d'ADN génomique.

L'invention concerne également un procédé comprenant :

- 15 a) la mise en contact d'une sonde nucléotidique d'un gène d'apoptose mitochondriale tel que le gène Bax avec l'échantillon biologique analysé, l'acide nucléique de l'échantillon ayant le cas échéant préalablement été rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions permettant l'hybridation de la sonde et de l'acide nucléique de l'échantillon
- b) la mise en évidence de l'hybride éventuellement formé.

On pourra utiliser un kit de diagnostic de la résistance à l'oxaliplatine comprenant

- 20 a) au moins un compartiment adapté pour contenir une amorce ou une sonde ;
- b) éventuellement les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction d'hybridation ;
- c) éventuellement au moins une amorce et les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN.

25 Selon un autre aspect l'invention concerne un procédé visant à déterminer si un traitement à l'oxaliplatine doit être poursuivi et/ou complété, caractérisé en ce qu'il comprend :

- a) l'obtention d'au moins deux échantillons comprenant des cellules cancéreuses issues du patient en cours de traitement à l'oxaliplatine ;
- 30 b) la mesure du niveau d'apoptose mitochondriale, par exemple à l'aide de la mesure d'expression de la protéine Bax, dans les échantillons ;

c) la poursuite du traitement lorsque le niveau d'apoptose ne diminue pas lors du traitement.

Selon un autre aspect l'invention concerne un procédé de sélection de composés inhibiteurs de la résistance à l'oxaliplatine, désignés composés anti-résistance, le 5 procédé comprenant la mesure de l'expression d'au moins un gène d'apoptose mitochondriale avant puis après l'addition d'un composé candidat à des cellules cancéreuses d'un patient résistantes à l'oxaliplatine.

In vitro, le procédé peut comprendre l'addition d'au moins un composé candidat à des cellules cancéreuses prélevées sur un patient résistantes à l'oxaliplatine, la 10 comparaison du niveau d'apoptose mitochondriale et/ou d'expression de gènes d'apoptose en présence et en absence du composé, la déduction de l'effet anti-résistance lorsque le niveau d'apoptose est supérieur après l'addition du composé. L'effet anti-résistance est également déduit si le niveau d'expression après addition du composé est supérieur lorsque le gène est un gène stimulateur d'apoptose, et 15 inférieur lorsque le gène est un gène inhibiteur de l'apoptose mitochondriale.

In vivo le procédé de sélection peut comprendre, chez un patient traité à l'oxaliplatine et résistant à l'oxaliplatine :

- a) l'obtention à un premier instant d'un premier échantillon comprenant des cellules cancéreuses du patient ;
- b) l'administration du composé candidat au patient ;
- c) l'obtention à un second instant d'un second échantillon comprenant des cellules cancéreuses du même patient ;
- d) la détermination du niveau d'apoptose mitochondriale et/ou du niveau d'expression d'au moins un gène d'apoptose mitochondriale tel que le gène Bax dans le premier et le second échantillon ;
- e) la déduction de l'effet anti-résistance à l'oxaliplatine du composé lorsque le niveau d'apoptose est supérieur dans le second échantillon.

L'effet anti-résistance est également déduit si le niveau d'expression est supérieur dans le second échantillon lorsque le gène est un gène stimulateur d'apoptose, et 30 inférieur si le gène est un gène inhibiteur de l'apoptose mitochondriale. De tels

procédés *in vivo* concernent de préférence des composés dérivés de composés déjà identifiés comme anti-résistants.

Par agent anti-résistance on entend un composé capable de diminuer, de préférence de compenser totalement, la résistance des patients à l'oxaliplatine. Ces agents anti-résistance sont destinés à rétablir le niveau normal d'expression d'au moins un gène d'apoptose mitochondriale, soit directement, soit indirectement par exemple par l'activation ou l'inhibition de molécules régulatrices de l'expression de ces gènes. Un agent anti-résistance pourra par exemple bloquer l'activité d'un composé responsable d'une inhibition anormale de l'activité de gènes d'apoptose au niveau de la transcription, de la traduction, ou de l'activité d'une protéine.

On peut rechercher des composés candidats notamment parmi des petites molécules, des polypeptides (par exemple oligopeptides, anticorps, fragments d'anticorps), des acides nucléiques. Les procédés de criblage d'agents antirésistance à l'oxaliplatine font typiquement intervenir des banques de molécules connues de l'homme du métier telles que des banques de substances biologiques (protéines notamment), des banques de substances synthétiques.

Des banques de composés peuvent se présenter sous forme de solution (e.g., Houghten (1992) Biotechniques 13:412-421), sur des billes (Lam (1991) Nature 354:82-84), sur des puces (Fodor (1993) Nature 364:555-556). On peut également utiliser des banques décrites dans les documents US 5 292 646 et 5 270 281.

On pourra étudier en particulier l'effet de composés déjà connus de l'homme du métier comme stimulateurs de l'apoptose mitochondriale, tels que le TNF (facteur de nécrose des tumeurs), le FasL, le glutamate, l'Herbimycin A (Mancini et al., J. Cell. Biol. 138:449-469, 1997), le Paraquat (Costantini et al., Toxicology 99:1-2, 1995), des inhibiteurs de protéines kinase tels que la Staurosporine, la Calphostin C, les dérivés de la d-érythro-sphingosine, le chlorure de Chélérythrine, des inducteurs de MAP kinase tels que l'Anisomycine, des inducteurs de MPT catégorie dont fait partie la protéine Bax (Jurgenmeier et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:4997-5002, 1998).

Parmi les tests permettant de mesurer le niveau d'apoptose mitochondriale, on peut citer la mesure de l'activité enzymatique de complexes mitochondriaux ETC I, II, III,

IV et de l'ATP synthétase, la mesure de la consommation mitochondriale d'oxygène (Miller et al, J. Neurochem. 67:1897, 1996), la mesure de l'état d'oxydation du cytochrome c mitochondrial à 540 nm, la mesure du stress oxydatif en présence et en absence de l'agent anti-résistance.

5 Selon un autre aspect l'invention concerne l'utilisation d'au moins un agent anti-résistance stimulateur de l'apoptose mitochondriale pour la préparation d'un médicament chez des patients présentant ou susceptibles de présenter une résistance à l'oxaliplatine. Par patient résistant on entend un patient présentant des cellules cancéreuses résistantes à l'oxaliplatine. On peut utiliser un tel agent anti-résistance
10 chez des patients présentant une réponse partielle au traitement à l'oxaliplatine pour améliorer l'efficacité du traitement.

Selon une réalisation les composés anti-résistance sont issus d'un procédé de sélection tel que décrit précédemment. L'homme du métier dispose de tests suffisamment décrits dans la demande pour sélectionner ces composés ; l'invention couvre donc également l'utilisation de ces composés, même si la structure chimique précise des composés n'est pas totalement identifiée : si un composé testé répond aux critères de sélection (en particulier stimulation de l'apoptose, augmentation de l'expression d'au moins un gène stimulateur d'apoptose, diminution de l'expression d'au moins un gène inhibiteur d'apoptose.), alors l'homme du métier pourra l'utiliser
15 pour la préparation d'un médicament anti-résistance à l'oxaliplatine sans avoir nécessairement besoin de connaître sa structure chimique.

Le traitement ciblera plus spécialement les cellules cancéreuses ayant acquis la résistance à l'oxaliplatine. Le traitement vise à rétablir un niveau d'expression ou d'activité de gènes impliqués dans l'apoptose mitochondriale suffisant pour que les
25 cellules cancéreuses résistantes réengagent plus activement ce processus. On recherchera une apoptose normale similaire à celle de cellules cancéreuses non résistantes, ou au moins une augmentation de l'apoptose mitochondriale suffisante pour réduire les symptômes cliniques.

Le traitement du patient fera intervenir typiquement l'association de l'oxaliplatine et
30 d'au moins un agent anti-résistance, selon une administration qui peut être simultanée, séparée ou étalée dans le temps. La quantité d'agents anti-résistance à

administrer aux patients doit être suffisante pour être thérapeutiquement efficace, pour réduire au moins partiellement la résistance à l'oxaliplatine. Le traitement combinant l'oxaliplatine et au moins un agent de antirésistance à l'oxaliplatine, chez un patient résistant, vise de manière préférentielle à obtenir une efficacité thérapeutique au moins égale à celle d'un traitement à l'oxaliplatine chez un patient non résistant.

L'invention concerne également une méthode de traitement d'un patient résistant à l'oxaliplatine ou susceptible de présenter une résistance à l'oxaliplatine, comprenant l'administration d'au moins un composé stimulateur de l'apoptose mitochondriale.

L'invention concerne également un procédé pour inhiber une résistance à l'oxaliplatine chez l'homme, comprenant l'administration d'un composé capable de stimuler sélectivement l'apoptose mitochondriale de cellules cancéreuses, chez un patient requérant un tel traitement anti-résistance.

La toxicité et l'efficacité thérapeutique des agents anti-résistance peuvent être déterminées par des techniques standard d'expérimentation sur les cultures de cellules ou des animaux de laboratoire. La transposition sur des patients humains connaissant ces données est obtenue à l'aide de méthodes appropriées.

Une formulation selon l'invention comprend de l'oxaliplatine typiquement dans une quantité de 1 à environ 10 mg/ml, de préférence 1 à 5 mg/ml, et encore préférée de 2 à 5 mg/ml. Les doses d'oxaliplatine administrées au patient résistant seront typiquement de l'ordre de 10mg/m²/jour à 250mg/ m²/jour, de préférence 20mg/ m²/jour à 200mg/ m²/jour, de préférence entre 50 et 150mg/ m²/jour.

L'administration peut être répétée pendant des cycles de 1 à 5 jours espacés d'un intervalle de 1 à 5 semaines. Pour des patients présentant une plus forte résistance, le clinicien déterminera la dose d'oxaliplatine appropriée, la dose d'agents anti-résistance, la durée du traitement.

On pourra associer le cas échéant à l'oxaliplatine et à l'agent anti-résistance au moins un composé connu de l'homme du métier pour renforcer l'efficacité et/ou la stabilité de l'oxaliplatine ; de tels agents sont décrits dans les documents EP 943 331 et WO

0166102.

L'oxaliplatine sera typiquement associée à un transporteur pharmaceutiquement acceptable, tel qu'un solvant approprié. Le transporteur sera en général de l'eau, ou un ou plusieurs solvants, ou un mélange d'eau et d'un ou plusieurs solvants appropriés.

On pourra préférer de l'eau pure stérile pour injection et parmi les solvants : les
5 polyalkylène glycols tels que le polyéthylène glycol, le polypropylène glycol, le polybutylène glycol et analogues, l'éthanol, le polymère 1-vinyl-2-pyrrolidone, des solutions de sucres pharmaceutiquement acceptables telles que le lactose, le dextrose, le sucre, le mannose, le mannitol, les cyclodextrines ou analogues. Le pH des formulations en solution d'oxaliplatine est typiquement de 2 à 5, de préférence de 3 à
10 4,5.

Les formulations de la présente invention seront administrées aux patients par des voies conventionnelles appropriées, typiquement par voie parentérale (par exemple intraveineuse, intrapéritonéale et analogues). L'administration intraveineuse se fera par exemple sur une période de 12 heures à 5 jours. Le pourcentage du composé actif dans les formulations mixtes selon l'invention comprenant l'oxaliplatine et au moins un agent de résistance, est adapté selon le dosage et le degré de résistance à l'oxaliplatine en particulier. Le dosage approprié pour un patient particulier sera déterminé notamment en fonction du type d'administration choisi, de la durée du traitement, de la taille, de l'âge, de la condition physique du patient, du degré de résistance à l'oxaliplatine, de la réponse du patient à la composition.
15 20

L'incorporation de l'agent antirésistance dans la composition d'oxaliplatine s'effectue par les techniques appropriées.

Pour une administration orale à l'aide de pastilles, poudres, granules et analogues, on pourra utiliser des excipients tels que le lactose, le chlorure de sodium, le sucre, le glucose, l'urée, l'amidon, le calcium, le kaolin, la cellulose cristalline, l'acide salicylique, la méthyle cellulose, le glycérol, l'alginate de sodium, la gomme arabique et analogues. On pourra utiliser des agents de liaison habituels tels que des solutions de glucose, des solutions d'amidon, des solutions de gélatine. On pourra utiliser des désintégrants tels que l'amidon, l'alginate de sodium, la poudre d'agar, le carbonate de calcium. Parmi les agents absorbants, on pourra utiliser l'amidon, le
25 30

lactose, le kaolin, la bentonite. Parmi les lubrifiants, on pourra utiliser le talc purifié, les sels d'acides stéariques, le polyéthylène glycol.

On prendra soin pour la formulation d'éviter des problèmes éventuels dus à l'association d'oxaliplatine et d'un agent anti-résistance tels que les problèmes de 5 précipitation des composés.

Une composition thérapeutique d'oxaliplatine comprendra typiquement 0,005% à 95%, de préférence 0,5 à 50% d'oxaliplatine et d'agents anti-résistance.

Sur le plan du mécanisme d'action, selon une réalisation, l'agent anti-résistance est un agent stimulateur de l'expression d'au moins un gène d'apoptose mitochondriale.

10 Selon une réalisation, l'agent anti-résistance est une molécule capable d'inhiber l'expression de gènes inhibiteurs de l'apoptose mitochondriale. On pourra utiliser des oligonucléotides antisens complémentaires d'ARNm codant des molécules inhibitrices de l'expression de gènes effecteurs d'apoptose. L'oligonucléotide antisens se liera spécifiquement à l'ARNm de telles molécules inhibitrices en inhibant leur traduction. La complémentarité devra être suffisante pour que l'hybridation avec 15 l'ARNm de la molécule inhibitrice conduise à la formation d'hybrides stables. Typiquement on utilisera des antisens d'une longueur comprise entre 6 et 50 nucléotides typiquement d'au moins 10 à 20 nucléotides. Les antisens peuvent être synthétisés par des méthodes connues de l'homme du métier en utilisant des 20 nucléotides modifiés pour augmenter la stabilité du duplex antisens/sens. On peut utiliser par exemple les nucléotides modifiés suivants : 5-fluorouracile, 5-bromouracile, 5-chlorouracile, 5-iodouracile, hypoxanthine, xanthine, 4-acetylcytosine, 5-(carboxyhydroxyméthyl) uracile, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracile, dihydrouracile, beta-D-galactosylqueosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracile, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracile, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarboxymethyluracile, 5-methoxyuracile, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, 5-methyl-2-thiouracile, 3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracile, 2,6-diaminopurine. Les antisens peuvent aussi être produits

biologiquement à l'aide d'un vecteur d'expression dans lequel l'antisens a été souscloné dans une orientation antisens.

L'antisens pourra le cas échéant être conjugué avec des molécules peptidiques facilitant son transport ou son activité au niveau du site d'action ciblée. On peut injecter les molécules antisens directement dans une zone cible du tissu, l'antisens peut être lié à des molécules telles que des peptides ou des anticorps capables de se lier spécifiquement à des récepteurs exprimés à la surface des cellules cibles.

L'administration d'antisens sera telle que ces molécules puissent agir à un niveau suffisant dans les mitochondries.

10 L'invention concerne selon un autre aspect une composition pharmaceutique comprenant de l'oxaliplatine et au moins un agent anti-résistance capable de stimuler l'apoptose mitochondriale, en stimulant l'expression de gènes d'apoptose mitochondriale ou en bloquant des effecteurs responsable de la résistance.

15 Selon une réalisation l'agent anti-résistance est un agent de régulation-stimulation de l'expression du gène Bax, et/ou un agent de blocage d'effecteurs de résistance.

20 L'expression de gènes d'apoptose mitochondriale peut être augmentée par le transfert d'acides nucléiques contenant une séquence codante pour le gène d'apoptose et/ou une séquence régulatrice, à l'aide de techniques de transfert appropriées pour les mitochondries. Ces séquences peuvent être liées dans des vecteurs d'expression et transférées dans les cellules, par exemple à l'aide de plasmides. L'acide nucléique inséré dans le vecteur peut coder la séquence complète de la protéine d'apoptose ou un fragment biologiquement actif ayant une activité de préférence d'au moins 50, 70, 90, 95% de l'activité de la protéine d'apoptose complète.

25 Les acides nucléiques utilisables dans les vecteurs d'expression peuvent être liés opérationnellement à des séquences régulatrices telle qu'une séquence promoteur ou enhancer qui stimule leur expression. Ces séquences régulatrices peuvent être celles associées naturellement aux gènes codant pour des protéines d'apoptose.

30 L'homme du métier connaît un grand nombre de techniques appropriées pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules par des vecteurs notamment plasmidiques, telles que la technique liposome-polybrène, la transfection DEAE dextran (Felgner et al., Proc.Natl.Acad, Sci.USA 84:7413,1987; Ono et

al., *Nuerosci.Lett.* 117:259,1990; Brigham et al., *Am.J.Med.Sci.* 298:278,1989), l'électroproration (Neumann et al. *EMBO J.* 7:841,1980), la précipitation au phosphate de calcium (Graham et al., *Virology* 52:456, 1973; Wigler et al., *Cell* 14:725,1978; Felgner et al., *supra*), la microinjection (Wolff et al., *Science* 247:1465,1990), les techniques biolistiques. On utilisera de préférence des vecteurs appropriés pour un transfert de gènes au niveau mitochondrial, par exemple le virus HBV (virus de l'hépatite B), transfert décrit par exemple dans le document US 6 100 068.
Ainsi, le traitement de la résistance à l'oxaliplatine repose sur l'utilisation de nouveaux procédés thérapeutiques, en particulier le recours à des substances chimiques et/ou à des thérapies géniques, capables de réduire la résistance en restaurant l'activation de l'apoptose mitochondriale normalement provoquée par l'oxaliplatine dans les cellules tumorales des cancers colo-rectaux.

D'autres objets et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description détaillée qui suit, illustrée par les figures suivantes :
- la figure 1 démontre que La lignée HCT116R, résistante à l'oxaliplatine, n'exprime pas la protéine Bax.
- la figure 2 démontre que les lignées HCT116R et SW620R résistent à l'induction apoptotique telle qu'elle est provoquée par l'oxaliplatine dans les lignées HCT116 et SW620 d'origine.
- la Figure 3 démontre que les lignées HCT116R et SW620R résistent également à l'induction apoptotique mitochondriale directe, qui peut être obtenue sous l'effet des agents arsenic et lonidamine.

25 Mise en place du modèle expérimental :

Les travaux ont été réalisés "in vitro" sur des lignées cellulaires de cancer colo-rectal (CCR) obtenues auprès de la collection internationale gérée aux Etats Unis (ATCC) et re-clonées au laboratoire. Ces lignées sont référencées, en particulier par l'Institut américain de recherche sur le cancer (NCI/NIH), comme standards pour l'évaluation pharmacologique des drogues anti-tumorales.

A partir de ces lignées, sensibles à l'effet cytotoxique de l'oxaliplatine, les inventeurs ont isolé des lignées dérivées capables de résister spécifiquement à l'oxaliplatine (et non aux autres médicaments que sont le cisplatine et l'irinotécan), en exposant ces cellules à des concentrations croissantes d'oxaliplatine, dans un schéma adapté à l'acquisition de la résistance. Les résultats présentés dans la demande concernent les lignées d'origine, HCT116 et SW620, ainsi que leurs dérivées HCT116R et SW620R, respectivement 70 et 20 fois plus résistantes que les lignées d'origine -Tableau 1-.

5 Tableau 1
10 « Les lignées HCT116R et SW620R dérivées des lignées de CCR HCT116 et SW620 sont spécifiquement résistantes à l'oxaliplatine. »

Lignée cellulaire	IC ₅₀ (μM) ^a		
	Oxaliplatine	Cisplatine	Irinotécan
HCT116	0.32 ± 0.08(1.0) ^b	4.7±1.8(1.0)	7.7 ± 3.8(1.0)
HCT116/R	21.9 ± 6.3(68.4)	13.4 ± 6.6(2.9)	9.5 ± 4.2(1.2)
SW620	3.4 ± 0.6(1.0)	7 ± 1.7 (1.0)	23.3 ± 0.6(1.0)
SW620/R	62.3 ± 12.9(18.3)	9 ± 1.7(1.4)	11.7 ± 2.5 (0.5)

15 ^a La concentration inhibitrice 50 ou IC₅₀ est la concentration de médicament qui diminue la croissance cellulaire de 50%. Les valeurs d'IC₅₀ ont été mesurées par le test colorimétrique WST-1 après incubation du médicament pendant 48 heures. Les valeurs correspondent à la moyenne ± SD obtenue à partir d'au moins trois expériences indépendantes.

20 ^b Les nombres entre parenthèses correspondent à la résistance relative, déterminée par le rapport de l' IC₅₀ du clone résistant divisée par l'IC₅₀ du clone parental.

25 Le tableau 1 montre que les lignées HCT116R et SW620R sont approximativement 70 fois et 20 fois plus résistantes à l'oxaliplatine que les lignées dont elles dérivent. Elles présentent très peu ou pas de résistance croisée au cisplatine et à l'irinotécan. Leur résistance est donc spécifique de l'oxaliplatine.

30 Le travail a été mené en parallèle sur deux modèles cellulaires de fonds génétiques différents de façon à pouvoir renforcer la signification des résultats observés ; ainsi, la

lignée SW 620 est issue d'une métastase et possède une protéine régulatrice p53 mutée alors que la lignée HCT116 est issue d'une tumeur primitive à instabilité microsatellite et possède une protéine p53 sauvage. L'observation de l'altération de l'apoptose mitochondriale associée au phénotype résistant (voir plus loin), dans deux contextes cellulaires différents, permet de généraliser les résultats et donc apportent une forte probabilité de son impact médical.

Exploration du modèle expérimental :

Les démonstrations essentielles ont été apportées sur ces deux lignées distinctes, de façon à corroborer le caractère universel de l'invention. Quelques études complémentaires ont été limitées à la lignée HCT116 et à sa dérivée HCT116R.

Les mécanismes moléculaires de résistance à l'oxaliplatine des cellules de CCR étant inconnus, les inventeurs ont étudié comparativement l'expression génique des phénotypes sensible et résistant dans le modèle HCT116 (analyse de transcriptome). Les inventeurs ont réussi à identifier un abaissement marqué du taux d'ARN messagers de certains gènes lié à l'apoptose, en particulier du gène Bax impliqué dans la voie dite "Apoptose mitochondriale" (AM).

Ces observations ont été renforcées par l'analyse biochimique (l'immuno-empreinte signale la disparition de l'expression de la protéine Bax) et par le séquençage du gène Bax (dans la lignée HCT116R, une mutation homozygote du gène Bax supprime son expression) -Figure 1-.

La figure 1 montre que la lignée HCT116R n'exprime pas la protéine Bax, avec ou sans traitement à l'oxaliplatine, alors que la lignée HCT116 d'origine l'exprime sans traitement et la sur-exprime après traitement par l'oxaliplatine. Un séquençage a démontré que la lignée HCT116R est mutante homozygote (délétion d'une déoxyguanosine) dans une région du gène Bax contenant une série de 8 déoxyguanosines (codons 38 à 41), ce qui interdit son expression par décalage du cadre de lecture. La lignée HCT116 d'origine étant hétérozygote G8/G7, elle exprime donc normalement le gène Bax.

Légende de la figure 1 : détection de Bax par Western-blotting en absence, ou sous l'effet d'un traitement, à l'oxaliplatine dans le modèle HCT116. Les cellules sont non traitées ou traitées par l'oxaliplatine à raison de 15 µM pendant 48 h (ou 50 µM

pendant 24 h) avant la préparation des lysats cellulaires. L'expression de la tubuline est utilisée comme contrôle de dépôts protéiques équivalents.

Les inventeurs ont focalisé les travaux sur l'étude fonctionnelle de cette voie, en liaison avec la résistance à l'oxaliplatine. Les principaux résultats obtenus sont les suivants :

- Dans un premier temps, les inventeurs ont démontré que les lignées HCT116R et SW620R, comparativement aux lignées d'origine, sont résistantes à l'induction d'apoptose par l'oxaliplatine. Les inventeurs ont également vérifié sur le modèle HCT116 que cette résistance à l'apoptose est spécifiquement développée vis à vis de l'oxaliplatine, puisque la lignée HCT116R reste sensible à l'induction d'apoptose par un autre médicament anti-CCR (l'irinotécan) dont le mécanisme d'action est différent - Figure 2A/2B/2C/2D - .

La figure 2 montre que les lignées HCT116R et SW620R résistent à l'induction d'apoptose par l'oxaliplatine. Cette résistance a été spécifiquement développée vis à vis de l'oxaliplatine : la lignée HCT116R ne résiste pas à l'induction apoptotique provoquée par un médicament anti-CCR au mode d'action différent, l'irinotécan (2A, 2B, 2D). La résistance à l'induction d'apoptose par l'oxaliplatine, observée par cytofluorimétrie après marquage par l'annexine V, est confirmée par le défaut d'activation de la caspase 3 (2C).

Légende de la figure 2 : les cellules HCT116 (et R) et SW620 (et R) sont traitées, durant 48 hrs préalablement à la détermination du degré d'apoptose, par l'oxaliplatine (2A et 2B) ou un autre médicament anti-CCR, l'irinotécan pour les cellules HCT116 et HCT116R (2D). Un contrôle est réalisé sans contact avec aucun médicament (Co). Le degré d'apoptose est alors déterminé en cytofluorométrie utilisant le marquage par l'annexin V. Indépendamment, l'activation de la protéine effectrice d'apoptose Caspase 3 a été évaluée dans les cellules HCT116 et HCT116R après traitement durant 24hrs avec l'oxaliplatine afin de valider l'entrée en apoptose des cellules telle qu'observée par cytofluorométrie(2C).

- Dans un deuxième temps, les inventeurs ont démontré que la résistance à l'apoptose induite par l'oxaliplatine des lignées HCT116R et SW620R s'accompagne d'une

résistance à l'induction de l'apoptose par deux agents chimiques connus pour être des activateurs directs de l'AM (trioxyde d'arsenic et lonidamine). -Figure 3 –

La figure 3 montre que les lignées HCT116R et SW620R sont résistantes à l'induction apoptotique sous l'effet des activateurs directs de l'AM que sont l'arsenic et la lonidamine.

Légende de la figure 3 : les cellules HCT116 (et R) et SW620 (et R) sont traitées, préalablement à la détermination du degré d'apoptose, durant 24 hrs par le trioxide d'arsenic (As), la lonidamine (LND) ou sont laissées sans traitement (contrôle, Co). Le degré d'apoptose est alors déterminé en cytofluorométrie après marquage au colorant "Mitocapture" qui fluoresce différemment dans les cellules apoptotiques et les cellules intactes (en relation avec l'intégrité mitochondriale).

Les inventeurs ont ainsi démontré que des altérations génétiques, biochimiques et fonctionnelles de l'apoptose sont associées à la résistance à l'oxaliplatine. Elles concernent deux lignées cellulaires de CCR sélectionnées séparément pour leur résistance spécifique à l'oxaliplatine. La pertinence de cette sélection est validée par les caractéristiques suivantes :

- L'acquisition de résistance à l'oxaliplatine est spécifique puisqu'elle ne s'accompagne pas d'une acquisition de résistance au cisplatine (molécule apparentée et présentant très fréquemment une résistance croisée à l'oxaliplatine) ou à l'irinotécan (autre molécule indiquée dans le traitement du CCR en alternative de l'oxaliplatine ou en association).

- La résistance à l'oxaliplatine, ainsi que les altérations fonctionnelles (résistance à l'apoptose) sont observées pour une concentration d'oxaliplatine équivalente au pic plasmatique chez l'homme au cours des traitements.

Les inventeurs ont démontré que la résistance à l'apoptose s'exerce au niveau mitochondrial. Cela est notamment démontré par des essais avec des inducteurs directs de l'AM. Ces altérations sont donc des marqueurs diagnostics de la résistance des cancers colo-rectaux à l'oxaliplatine. De plus, il est probable que la modulation pharmacologique de la voie de l'AM, permettra de restaurer tout ou partie de la sensibilité des CCR à l'oxaliplatine. Les inventeurs ont en effet vérifié, par une étude

de plusieurs mois de suivi des lignées cellulaires dérivées, que leur phénotype de résistance est spontanément réversible en l'absence de pression pharmacologique (= culture cellulaire sans oxaliplatine). Cette réversibilité, totale ou partielle selon les cas, permet de prévoir une réversion sous l'effet d'une substance contrariant ou 5 contournant les mécanismes de résistance au sein de l'AM.

Les inventeurs ont en outre développé la purification de mitochondries à partir de lignées sensibles et résistantes afin d'isoler et de tester les effecteurs putatifs de la résistance (comme le PTPC), ainsi que des agents de blocage de ces effecteurs (ARN 10 anti-sens, substances déjà connues pour bloquer un mécanisme physiologique au niveau de l'AM...). L'invention couvre également la mise en œuvre de transferts de gène restaurant le phénotype de sensibilité à l'oxaliplatine, et de procédés de criblage de nouvelles entités chimiques permettant de contrarier ou contourner la résistance, à partir des effecteurs comme cibles et de banques de substances chimiques comme sources.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection *in vitro* de la résistance de cellules cancéreuses à un traitement à l'oxaliplatine caractérisé en ce qu'il comprend la mesure de l'apoptose mitochondriale de cellules cancéreuses traitées ou pouvant ou devant être traitées à l'oxaliplatine.
5
2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le cancer est un cancer traité à l'oxaliplatine, notamment un cancer colorectal, un cancer des ovaires, un cancer des cellules germinales, un cancer du poumon, un cancer des voies digestives,
10 un cancer de la prostate, un cancer du pancréas, un cancer de l'intestin grêle, un cancer de l'estomac.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il comprend la mesure de l'expression d'au moins un gène d'apoptose mitochondriale.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il comprend la mesure de l'expression d'au moins un gène codant pour une protéine Bax, Bcl-2, cytochrome c.
15
5. Procédé selon la revendication 3 ou 4 caractérisé en ce qu'il comprend la mesure des ARNm transcrits des gènes d'apoptose mitochondriale.
6. Procédé selon la revendication 3 ou 4 caractérisé en ce qu'il comprend la
20 mesure de la quantité et/ou de l'activité de protéines d'apoptose mitochondriale dans les cellules cancéreuses.
7. Procédé de détection *in vitro* de la résistance de cellules cancéreuses à un traitement à l'oxaliplatine caractérisé en ce qu'il comprend la détection d'au moins une mutation indicatrice d'une apoptose mitochondriale déficiente en cas de
25 traitement à l'oxaliplatine, notamment d'une mutation dans une région du gène Bax contenant une série de 8 déoxyguanines.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'il comprend :
 - a) la détermination du niveau d'apoptose mitochondriale, et/ou du niveau
30 d'expression d'au moins un gène d'apoptose mitochondriale, sur des cellules cancéreuses prélevées chez un patient ;

b) la comparaison du niveau mesuré avec un échantillon contrôle de cellules non résistantes à l'oxaliplatine.

9. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact des cellules cancéreuses avec un anticorps capable de reconnaître une protéine d'apoptose mitochondriale ou un fragment biologiquement actif, et la mise en évidence du complexe antigène-anticorps éventuellement formé.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisé en ce qu'il met en œuvre une séquence amorce ou sonde spécifique de gène d'apoptose mitochondriale.

10 11. Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il comprend
a) éventuellement l'isolement de l'ADN mitochondrial à partir de l'échantillon biologique à examiner, ou l'obtention d'un ADNc à partir de l'ARN de l'échantillon biologique ou d'ADN génomique ;
15 b) l'amplification spécifique de l'ADN du a) à l'aide d'au moins une amorce d'amplification de gène d'apoptose mitochondriale.

12. Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il comprend
a) la mise en contact d'une sonde nucléotidique d'un gène d'apoptose avec l'échantillon biologique analysé, l'acide nucléique de l'échantillon ayant le cas échéant préalablement été rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions 20 permettant l'hybridation de la sonde et de l'acide nucléique de l'échantillon ;
b) la mise en évidence de l'hybride éventuellement formé.

13. Procédé de sélection de composé inhibiteurs de la résistance de cellules cancéreuses à l'oxaliplatine, caractérisé en ce qu'il comprend :
a) l'addition d'au moins un composé candidat à des cellules cancéreuses résistantes à 25 l'oxaliplatine ;
b) la comparaison du niveau d'apoptose mitochondriale et/ou d'expression d'au moins un gène d'apoptose en présence et en absence du composé ;
c) la déduction de l'effet anti-résistance lorsque le niveau d'apoptose mitochondriale est supérieur après l'addition du composé, ou lorsque le niveau d'expression est 30 supérieur dans le cas où le gène est un gène stimulateur d'apoptose mitochondriale,

ou lorsque le niveau d'expression est inférieur dans le cas où le gène est un gène inhibiteur d'apoptose mitochondriale.

14. Utilisation d'au moins un agent anti-résistance à l'oxalipatine stimulateur de l'apoptose mitochondriale, pour la préparation d'un médicament chez des patients présentant ou susceptibles de présenter une résistance à l'oxaliplatine.

5 15. Utilisation selon la revendication 14 pour la préparation d'un médicament contre un cancer colorectal, des ovaires, des cellules germinales, du poumon, des voies digestives, de la prostate, du pancréas, de l'intestin grêle, de l'estomac.

10 16. Utilisation selon la revendication 14 pour la préparation d'un médicament contre les cancers colorectaux.

17. Utilisation, en association, d'un agent anti-résistance à l'oxaliplatine et d'oxaliplatine, dans une administration simultanée, séparée ou espacée dans le temps.

15 18. Utilisation d'au moins un agent anti-résistance à l'oxalipatine obtenu par un procédé de sélection selon la revendication 13, pour la préparation d'un médicament chez des patients présentant ou susceptibles de présenter une résistance à l'oxaliplatine.

19. Composition comprenant de l'oxaliplatine et au moins un agent anti-résistance capable de stimuler l'apoptose mitochondriale.

20 20. Composition selon la revendication 19 caractérisé en ce que l'agent stimulateur est un agent de régulation-stimulation de l'expression du gène Bax, et/ou un agent de blocage d'effecteurs de résistance .

21. Kit de diagnostic de la résistance d'un cancer à l'oxaliplatine en ce qu'il comprend :

a) un anticorps monoclonal ou polyclonal ;

25 b) éventuellement les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ;

c) éventuellement les réactifs permettant la mise en évidence des complexes antigènes-anticorps produits par la réaction immunologique.

22. Kit de diagnostic de la résistance d'un cancer à l'oxaliplatine caractérisé en ce

30 qu'il comprend des moyens d'extraction de l'ADN mitochondrial de cellules

ou lorsque le niveau d'expression est inférieur dans le cas où le gène est un gène inhibiteur d'apoptose mitochondriale.

14. Utilisation d'au moins un agent stimulateur de l'apoptose mitochondriale, notamment choisi parmi le TNF, le FasL, le glutamate, l'Herbimycin A, le Paraquat, des inhibiteurs de protéines kinase tels que la Staurosporine, la Calphostin C, les dérivés de la d-érythro-sphingosine, le chlorure de Chélérythrine, des inducteurs de MAP kinase tels que l'Anisomycine, des inducteurs de MPT pour la préparation d'un médicament chez des patients présentant ou susceptibles de présenter une résistance à l'oxaliplatine.
15. Utilisation selon la revendication 14 pour la préparation d'un médicament contre un cancer colorectal, des ovaires, des cellules germinales, du poumon, des voies digestives, de la prostate, du pancréas, de l'intestin grêle, de l'estomac.
16. Utilisation selon la revendication 14 pour la préparation d'un médicament contre les cancers colorectaux.
17. Produit contenant l'oxaliplatine et un agent stimulateur d'apoptose mitochondriale, notamment choisi parmi le TNF, le FasL, le glutamate, l'Herbimycin A, le Paraquat, des inhibiteurs de protéines kinase tels que la Staurosporine, la Calphostin C, les dérivés de la d-érythro-sphingosine, le chlorure de Chélérythrine, des inducteurs de MAP kinase tels que l'Anisomycine, des inducteurs de MPT comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou espacée dans le temps en tant qu'anti-cancéreux.
18. Composition comprenant de l'oxaliplatine et au moins un agent anti-résistance capable de stimuler l'apoptose mitochondriale, choisi parmi le TNF, le FasL, le glutamate, l'Herbimycin A, , le Paraquat, des inhibiteurs de protéines kinase tels que la Staurosporine, la Calphostin C, les dérivés de la d-érythro-sphingosine, le chlorure de Chélérythrine, des inducteurs de MAP kinase tels que l'Anisomycine, des inducteurs de MPT.
19. Kit de diagnostic de la résistance d'un cancer à l'oxaliplatine caractérisé en ce qu'il comprend :
 - a) au moins un compartiment adapté pour contenir une sonde ;

cancéreuses, des moyens de détection et d'amplification d'ARNm de gènes d'apoptose mitochondriale ou d'ADN génomique.

23. Kit de diagnostic de la résistance d'un cancer à l'oxaliplatine caractérisé en ce qu'il comprend :

- 5 a) au moins un compartiment adapté pour contenir une sonde ;
- b) éventuellement les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction d'hybridation ;
- c) éventuellement au moins une amorce et les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN.

- b) éventuellement les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction d'hybridation ;
- c) éventuellement au moins une amorce et les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN.

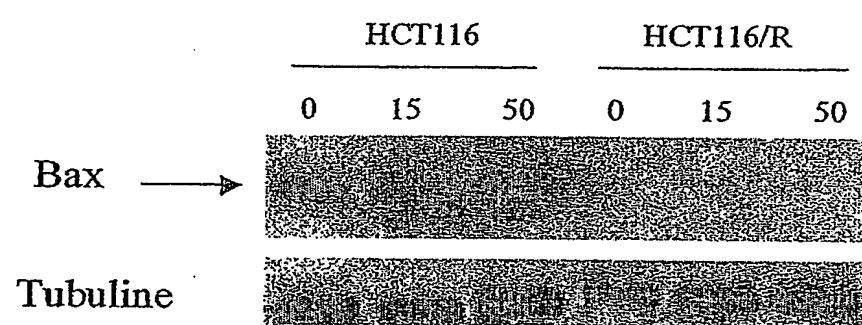
Figure 1

Figure 2a

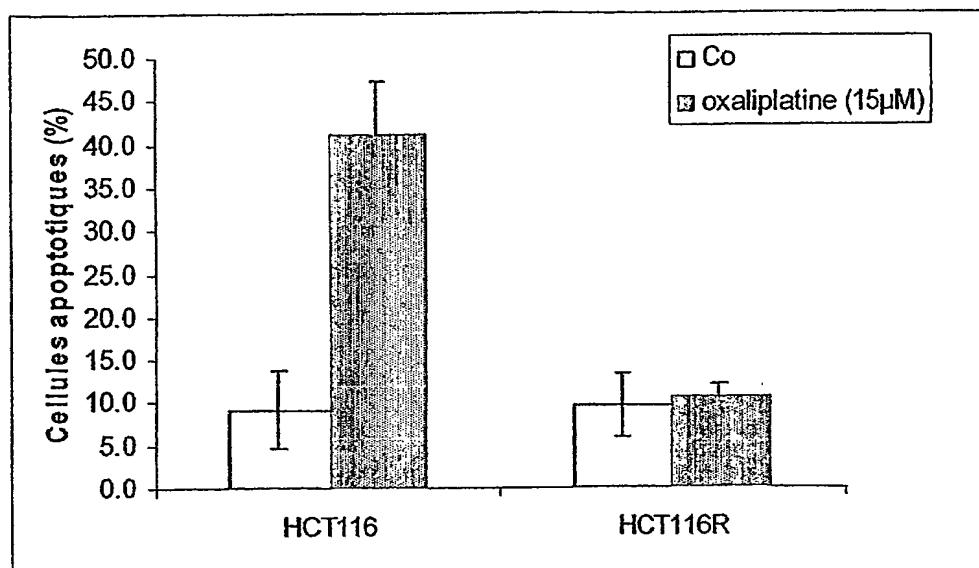


Figure 2b

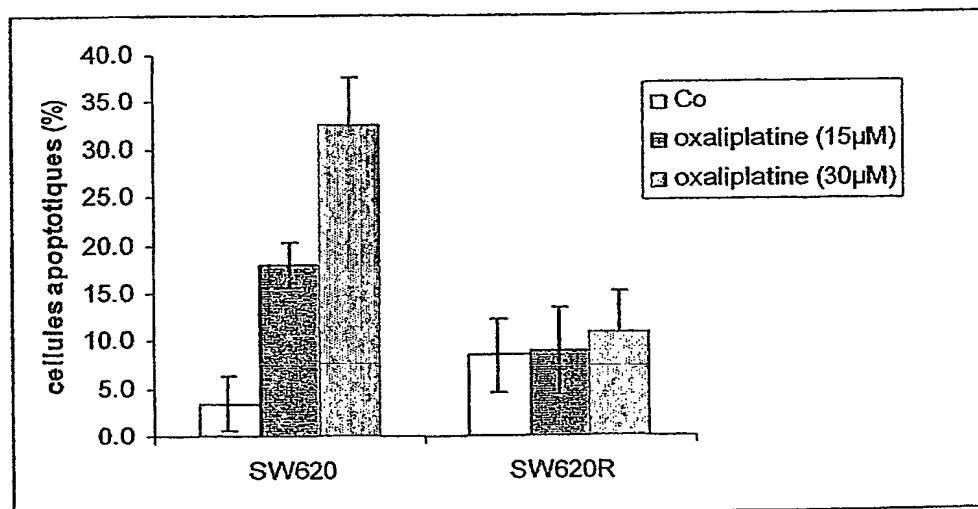
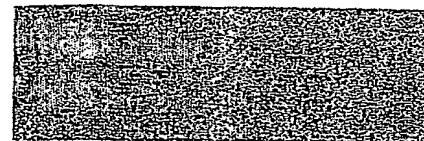


Figure 2c

Caspase 3 clivée



Tubuline

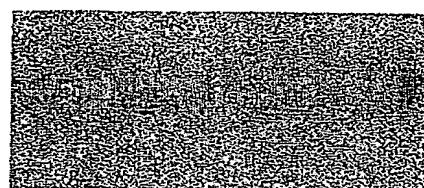


Figure 2d

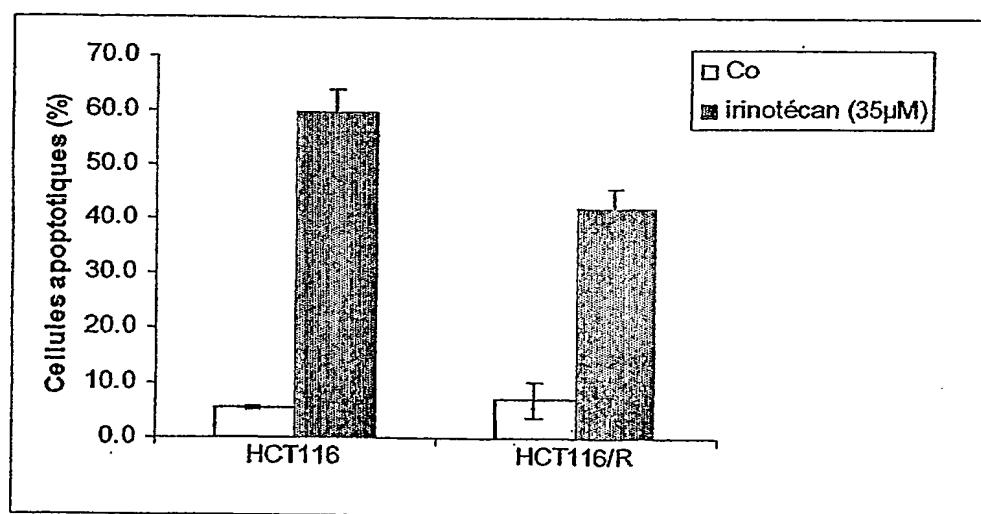


Figure 3a

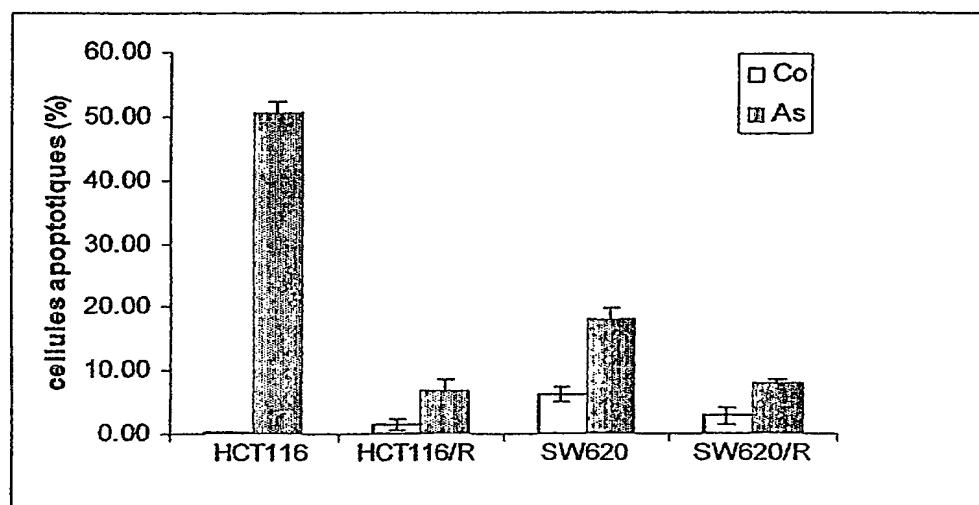
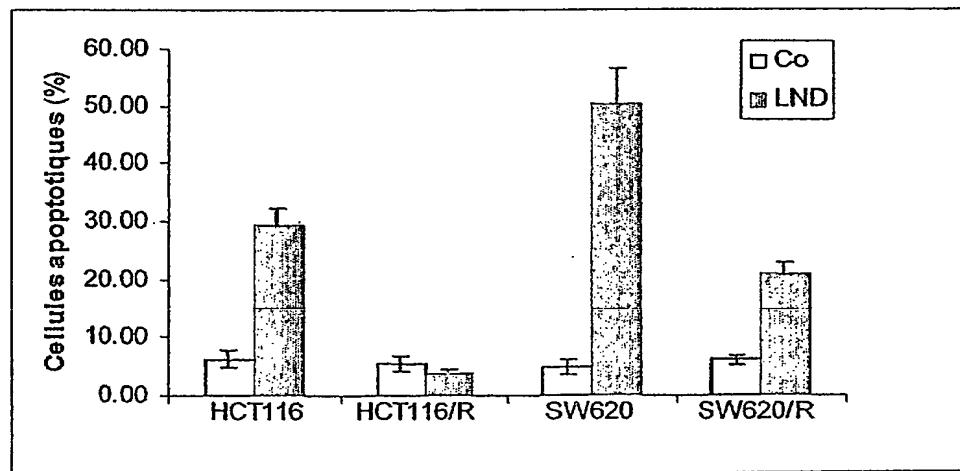


Figure 3b



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.